

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D	17 JUL 1998
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年 5月23日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9年特許願第134182号

出 願 人

Applicant(s):

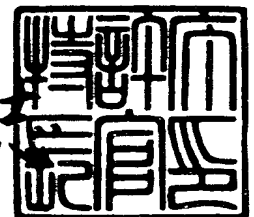
遠藤 仁

PRIORITY DOCUMENT

1998年 7月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 建 彦



出証番号 出証特平10-3048877

【書類名】 特許願

【整理番号】 B00-0196

【提出日】 平成 9年 5月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 41/00

【発明の名称】 有機陰イオントランスポーター及びその遺伝子

【請求項の数】 17

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市由野台 1-23-7

 【氏名】 遠藤 仁

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都八王子市緑町 214-102

 【氏名】 金井 好克

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都立川市栄町 1-10-47

 【氏名】 関根 孝司

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都三鷹市下連雀 3-42-4-301

 【氏名】 細山田 真

【特許出願人】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市由野台 1-23-7

 【氏名又は名称】 遠藤 仁

【代理人】

 【識別番号】 100076923

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 箕浦 繁夫

 【電話番号】 06-300-2726

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 016322

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 有機陰イオントランスポーター及びその遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(A)、(B)、(C)及び(D)から選択されるタンパク質。

(A) 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(B) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。

(C) 配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(D) 配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。

【請求項2】 ヒト由来である請求項1記載のタンパク質。

【請求項3】 ラット由来である請求項1記載のタンパク質。

【請求項4】 腎臓組織由来である請求項1記載のタンパク質。

【請求項5】 請求項1記載のタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項6】 以下の(a)、(b)、(c)及び(d)から選択されるDNAからなる遺伝子。

(a) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

(b) 配列番号1で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

(c) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNA。

(d) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項7】 ヒト由来である請求項6記載DNA。

【請求項8】 ラット由来である請求項6記載の遺伝子。

【請求項9】 腎臓組織由来である請求項6記載の遺伝子。

【請求項10】 請求項5～9のいずれかの項に記載の遺伝子もしくは該遺伝子の中のタンパク質をコードする領域を含むプラスミド。

【請求項11】 発現プラスミドである請求項10記載のプラスミド。

【請求項12】 請求項10記載のプラスミドで形質転換された宿主細胞。

【請求項13】 配列番号1又は2で示される塩基配列の中の連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチド。

【請求項14】 有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子を検出するためのプローブとして使用するものである請求項13記載のヌクレオチド。

【請求項15】 有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現を変調させるために使用するものである請求項13記載のヌクレオチド。

【請求項16】 請求項1～4のいずれかの項に記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項17】 請求項1～4のいずれかの項に記載のタンパク質を用いて、該タンパク質の有する有機陰イオンを輸送する能力に対する被検物質の基質としての作用を検定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は有機陰イオンの輸送に関与する遺伝子と、その遺伝子がコードするポリペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】

腎臓は、生体異物や薬物の体外への排出に関して、重要な役割を果たしている。アニオン性の薬物は、担体を介した経路で腎臓近位尿細管から尿中へ排出され

ている。このような有機陰イオンの排出は、尿細管細胞がその側底膜を介して、有機陰イオンを尿細管周囲の血液から取り込むことから始まる。

【0003】

側底膜における有機陰イオンの取り込みについては、例えば基質の有機陰イオンとしてパラアミノ馬尿酸塩を使い、摘出臓器かん流法や単離細胞膜小胞系などを用いた実験により研究されてきた。この研究の中で、有機陰イオンの取り込みには、有機陰イオントランスポーターが関与していること、また、側底膜における有機陰イオンの取り込みは、有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送体によって介され则认为られてきた。

【0004】

しかし、従来の手法では、尿細管における輸送機構の詳細、例えばトランスポーター間での輸送のネットワークや腎排泄過程における薬物間の相互作用などを解析することは困難であり、有機陰イオントランスポーターの遺伝子を単離して詳細な機能解析を可能とすることが望まれていた。

【0005】

肝臓で発現している有機陰イオントランスポーター遺伝子については、種々の分子種がクローニングされている〔Hagenbuchら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第88巻、10629頁、1991年、Jacqueminら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第91巻、133頁、1994年、Shiら、J. Biol. Chem.、第270巻、25591頁、1995年、およびKanaiら、Am. J. physiol.、第270巻、F319頁、1996年〕。また、腎臓および肝臓に発現する有機陽イオントランスポーターの一つであるOCT1の遺伝子クローニングが報告されている〔Grundemannら、Nature、第372巻、549頁、1994年〕。

【0006】

また、ジカルボン酸のトランスポーターとして、腎臓のナトリウム依存性ジカルボン酸トランスポーター（NaDC-1）の遺伝子クローニングが報告されている〔Pajorら、J. Biol. Chem.、第270巻、5779頁、1995年〕。

【0007】

また、最近、ナトリウム非依存性ラット肝有機陰イオントランスポーター（oatp）の類縁遺伝子として、ラットの腎尿細管に局在する有機陰イオントランスポー

タOAT-K1の遺伝子のクローニングが報告された〔Saitoら、J.Biol.Chem.、第270巻、20719頁、1996年〕。しかしながら、このOAT-K1については、その輸送機構が、有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送によるものであるとは確認されていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、腎臓における有機陰イオン輸送に関与する新規な有機陰イオントランスポーター遺伝子及びその遺伝子がコードするポリペプチドである有機陰イオントランスポーターを提供することにある。その他の目的については、以下の記載より明らかである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ラット腎臓細胞から、有機陰イオンを輸送する能力を有する新規タンパク質の遺伝子をクローニングし、さらにヒトの相同遺伝子（ホモログ）をクローニングした。さらに、これら遺伝子の産物をアフリカツメガエルの卵母細胞中で発現させて有機陰イオンの輸送能を確認することに成功し、本発明を完成するにいたった。

【0010】

すなわち、本発明は、以下の（A）、（B）、（C）及び（D）から選択されるタンパク質である。

（A）配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（B）配列番号1で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。

（C）配列番号2で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

（D）配列番号2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。

【0011】

また、本発明は、以下の（a）、（b）、（c）及び（d）から選択されるDNAからなる遺伝子である。

（a）配列番号1で示される塩基配列からなるDNA。

（b）配列番号1で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

（c）配列番号2で示される塩基配列からなるDNA。

（d）配列番号2で示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質をコードするDNA。

【0012】

本発明の有機陰イオンを輸送する能力を有する新規タンパク質、すなわち有機陰イオントランスポーター（OAT1：Organic Anion Transporter 1）は、生体内においては腎臓の尿細管で主に発現している。

【0013】

また、有機陰イオントランスポーターOAT1は、その有機陰イオン輸送能（発現細胞への有機陰イオン取り込み）がジカルボン酸の存在によって活性化される。このことから、有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送を行うトランスポーターであると考えられる。また、交換輸送に際しては、OAT1によって有機陰イオンと交換に細胞外にだされるジカルボン酸は、ナトリウム依存性ジカルボン酸トランスポーター（NaDC-1）によって細胞に取り込まれ、リサイクルされることが考えられる。

【0014】

また、本発明の有機陰イオントランスポーターOAT1は、環状塩基、プロスタグランジン、尿酸のほか、抗生物質、非ステロイド系抗炎症薬、利尿薬、抗腫瘍薬等種々の異なる構造を持った薬物に対してこれらを輸送する（取り込む）能力を有する、非常に広い範囲の基質選択性を有するものである。

【0015】

また、本発明の有機陰イオントランスポーターOAT1は、既に報告されているラット腎の有機陰イオントランスポーターOAT-K1とは、相同性がなく、全く別の分子種であると考えられる。

【0016】

【発明の実施の形態】

後記配列表の配列番号1は、ラットの腎臓由来の有機陰イオントランスポーター（ラットOAT1）の遺伝子の全長cDNA塩基配列（約2.2kbp）、及びその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列（551アミノ酸）を表す。

【0017】

配列番号2は、ヒトの腎臓由来の有機陰イオントランスポーター（ヒトOAT1）の遺伝子の全長cDNA塩基配列（約2.2kbp）、及びその翻訳領域にコードされたタンパク質のアミノ酸配列（563アミノ酸）を表す。

【0018】

前記配列番号1及び2に示される塩基配列もしくはアミノ酸配列について、既知DNAデータベース（GenBankおよびEMBL）及びプロテインデータベース（NBRF及びSWISS-PROT）に含まれる全ての配列に対してホモロジー検索を行った結果、一致するものはなく、これら配列は、新規なものであると考えられる。

【0019】

本発明のタンパク質としては、配列番号1又は2で示されたアミノ酸配列を有するもののほか、例えば配列番号1又は2で示されたアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。アミノ酸の欠失、置換もしくは付加は、有機陰イオン輸送活性が失われない程度であればよく、通常1～約110個、好ましくは1～約55個である。このようなタンパク質は、配列番号1又は2で示されたアミノ酸配列と通常、1～80%、好ましくは1～90%のアミノ酸配列のホモロジーを有する。

【0020】

また、本発明の遺伝子としては、配列番号1又は2で示された塩基配列を有するDNAを含むもののほか、配列番号1又は2で示された塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るDNAを含むものが挙げられる。このようにハイブリダイズし得るDNAは、そのDNAにコードされるタンパク質が有機陰イオンを輸送する能力を有するものであればよい。このようなDNAは、配列番号1又は2で示された塩基配列と、通常、70%以上、好ましくは80%以上の塩基配列のホモロジーを有する。このようなDNAとしては、自然界で発見される変異型遺伝子、人為的に改変した変異型遺伝子、異種生物由来の相同遺伝子等が含まれる。

【0021】

本発明において、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、通常、ハイブリダイゼーションを、 $5 \times \text{SSC}$ 又はこれと同等の塩濃度のハイブリダイゼーション溶液中、 $37-42^{\circ}\text{C}$ の温度条件下、約12時間行い、 $5 \times \text{SSC}$ 又はこれと同等の塩濃度の溶液等で必要に応じて予備洗浄を行った後、 $1 \times \text{SSC}$ 又はこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。また、より高いストリンジェンシーを得るためには、洗浄を $0.1 \times \text{SSC}$ 又はこれと同等の塩濃度の溶液中で洗浄を行うことにより実施できる。

【0022】

本発明の有機陰イオントランスポーター遺伝子は、適当な哺乳動物の腎臓の組織や細胞を遺伝子源として用いてスクリーニングを行うことにより単離取得できる。哺乳動物としては、イヌ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、サル、ブタ、ウサギ、ラット及びマウスなどの非ヒト動物のほか、ヒトが挙げられる。

【0023】

遺伝子のスクリーニング及び単離は、発現クローニング法 (Expression Cloning) などにより好適に実施できる。

【0024】

例えば、ラット腎臓組織を遺伝子源として用い、これからmRNA (ポリ (A)⁺RNA) を調製する。これを、分画し、各画分について、ラットナトリウム

依存性ジカルボン酸塩トランスポーター (NaDC-1) の cRNA とともに、アフリカツメガエルの卵母細胞に導入する。

【0025】

NaDC-1 遺伝子の cDNA はすでに報告されている [Pajor ら、J. Biol. Chem., 第270巻、5779頁、1995年] ので、この配列情報から、PCR法などを用いて、容易に NaDC-1 遺伝子の cDNA を得ることが可能である。得られた NaDC-1 cDNA から、T3 又は T7 RNA ポリメラーゼ等を用いて、これに相補的な RNA (cRNA) (キャップ化されたもの) を合成できる。

【0026】

mRNA と、NaDC-1 cRNA を導入した卵母細胞について、例えばパラアミノ馬尿酸 (PAH) などを基質 (有機陰イオン) として、細胞内への基質の輸送 (取込み) を測定し、高い取り込みを示した mRNA の画分を選択することにより、OAT1 の mRNA を濃縮できる。この濃縮された mRNA をもとに、cDNA ライブラリを作製する。ライブラリの cDNA から、cRNA (キャップ化されたもの) を調製し、各々のクローンについて、前記と同様にして、NaDC-1 cRNA とともに卵母細胞に導入し、基質の取り込み活性を指標として、陽性クローンを選択することにより、OAT1 遺伝子の cDNA を含むクローンを得ることができる。

【0027】

得られた cDNA については、常法により塩基配列を決定し、翻訳領域を解析して、これにコードされるタンパク質、すなわち、OAT1 のアミノ酸配列を決定することができる。

【0028】

得られた cDNA が、有機陰イオントランスポーター遺伝子の cDNA であること、すなわちは cDNA にコードされた遺伝子産物が有機陰イオントランスポーターであることは、例えば次のようにして検証することができる。すなわち、得られた OAT1 遺伝子の cDNA から調製した cRNA を卵母細胞内に導入して発現させ、有機陰イオンを細胞内への輸送する (取り込む) 能力を、前記と同様、適当な有機陰イオンを基質とする通常の実験 (Kanai and Hediger, N

ature、第360巻、467-471頁、1992年）により、細胞内への基質の取り込みを測定することにより確認できる。

【0029】

また、発現細胞について、同様の取り込み実験を応用して、OAT1の特性、例えば、OAT1がジカルボン酸との交換輸送を行っているという特性や、OAT1の基質特異性などを調べることができる。

【0030】

得られたOAT1遺伝子のcDNAを用いて、異なる遺伝子源で作製された適当なcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、異なる組織、異なる生物由来の相同遺伝子や染色体遺伝子等を単離することができる。

【0031】

また、開示された本発明の遺伝子の塩基配列（配列番号1および2に示された塩基配列、もしくはその一部）の情報に基づいて設計された合成プライマーを用い、通常のPCR（Polymerase Chain Reaction）法によりcDNAライブラリー又はゲノミックDNAライブラリーから遺伝子を単離することができる。

【0032】

cDNAライブラリー及びゲノミックDNAライブラリー等のDNAライブラリーは、例えば、「Molecular Cloning」[Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により調製することができる。あるいは、市販のライブラリーがある場合はこれを用いてもよい。

【0033】

本発明の有機陰イオントランスポーター（OAT1）は、例えば、有機陰イオントランスポーターをコードするcDNAを用い、遺伝子組換え技術により生産することができる。例えば、有機陰イオントランスポーターをコードするDNA（cDNA等）を適当な発現ベクターに組み込み得られた組換えDNAを適当な宿主細胞に導入することができる。ポリペプチドを生産するための発現系（宿主-ベクター系）としては、例えば、細菌、酵母、昆虫細胞および哺乳動物細胞の

発現系等が挙げられる。このうち、機能タンパクを得るためには、昆虫細胞および哺乳動物細胞を用いることが好ましい。

【0034】

例えば、ポリペプチドを哺乳動物細胞で発現させる場合には、有機陰イオントランスポーターをコードするDNAを、適当な発現ベクター（例えば、レトロウイルス系ベクター、パピローマウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、SV40系ベクター等）中の適当なプロモーター（例えば、SV40プロモーター、LTRプロモーター、エロンゲーション1 α プロモーター等）の下流に挿入して発現ベクターを構築する。次に、得られた発現ベクターで適当な動物細胞を形質転換し、形質転換体を適当な培地で培養することによって、目的とするポリペプチドが生産される。宿主とする哺乳動物細胞としては、サルCOS-7細胞、チャイニーズハムスターCHO細胞、ヒトHeLa細胞又は、腎臓組織由来の初代培養細胞やブタ腎由来LLC-PK1細胞、フクロネズミ腎由来OK細胞等の細胞株等が挙げられる。

【0035】

有機陰イオントランスポーターOAT1をコードするDNAとしては、例えば、配列番号1及び2に示される塩基配列を有するcDNAを用いることができるほか、前記のcDNA配列に限定されることなく、アミノ酸配列に対応するDNAを設計し、ポリペプチドをコードするDNAとして用いることもできる。この場合、ひとつのアミノ酸をコードするコドンは各々1～6種類知られており、用いるコドンの選択は任意でよいが、例えば発現に利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる。設計した塩基配列を持つDNAは、DNAの化学合成、前記cDNAの断片化と結合、塩基配列の一部改変等によって取得できる。人為的な塩基配列の一部改変、変異導入は、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用して部位特異的変異導入法 (site specific mutagenesis) [Mark, D. F. et al., Proceedings of National Academy of Sciences, 第81巻, 第5662～5666頁 (1984年)] 等によって実施できる。

【0036】

本発明の有機陰イオントランスポーター遺伝子にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド（オリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド）は、有機陰イオントランスポーター遺伝子を検出するためのプローブとして使用できるほか、有機陰イオントランスポーター遺伝子の発現を変調させるために、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドや、リボザイム、デコイとして使用することもできる。このようなヌクレオチドとしては、例えば、配列番号1又は2で示される塩基配列の中の通常、連続する14塩基以上の部分配列もしくはその相補的な配列を含むヌクレオチドを用いることができ、ハイブリダイズをより特異的とするためには部分配列としてより長い配列、例えば20塩基以上あるいは30塩基以上の配列を用いてもよい。

【0037】

また、本発明の有機陰イオントランスポーター又はこれと免疫学的同等性を有するポリペプチドを用いて、その抗体を取得することができ、抗体は、有機陰イオントランスポーターの検出や精製などに利用できる。抗体は、本発明の有機陰イオントランスポーター、その断片、またはその部分配列を有する合成ペプチド等を抗原として用いて製造できる。ポリクローナル抗体は、宿主動物（例えば、ラットやウサギ等）に抗原を接種し、免疫血清を回収する、通常の方法により製造することができ、モノクローナル抗体は、通常ハイブリドーマ法などの技術により製造できる。

【0038】

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

【0039】

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、「Molecular Cloning」[Sambrook, J., Fritsch, E.F.及びManiatis, T. 著、Cold Spring Harbor Laboratory Pressより1989年に発刊]に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【0040】

【実施例】

実施例1 ラット有機陰イオントランスポーターのクローニング

(1) ラットジカルボン酸塩トランスポーター cDNA の単離と cRNA 調製

cDNA ライブラリーは、ラットポリ(A)⁺RNA から、cDNA 合成用キット (商品名: SuperScript Choice System、ギブコ社製) を使用して作成し、ファージベクター λ Ziplox (ギブコ社製) の制限酵素 EcoRI 切断部位に組み込んだ。PCR 法にて、ウサギのナトリウム依存性ジカルボン酸トランスポーター NaDC-1 遺伝子 [Pajor ら、J. Biol. Chem., 第270巻、5779頁、1995年] の第1323-1763番目の塩基に相当するセグメントを ³²P-dCTP でラベルし、これをプローブとして用いて、ラットの cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、37℃のハイブリダイゼーション用溶液中一晩行い、フィルター膜は、37℃で0.1×SSC/0.1% SDS で洗浄した。ハイブリダイゼーション用溶液としては、5×SSC、3×デンハード液 (Denhard' s 液)、0.2% SDS、10% 硫酸デキストラン、50% ホルムアミド、0.01% Antiform B (商品名、シグマ社製) (消泡剤)、0.2mg/ml サーモン精子変性DNA、2.5mM ピロリン酸ナトリウム、25mM MES を含む pH 6.5 の緩衝液を用いた。 λ Ziplox ファージに組込まれた cDNA 部分を、塩基配列決定のために、プラスミド pZL1 に組み込み、さらにプラスミド pBluescript IISK- (Stratagene 社製) ヘサブクローン化した。

【0041】

上記により得られたラットジカルボン酸塩トランスポーターの cDNA を含むプラスミドから、T7 RNA ポリメラーゼを用いて、cRNA (cDNA に相補的な RNA) を調製した。

【0042】

得られた cRNA を、金井らの方法 (Kanai and Hediger, Nature, 第360巻、第467-471頁、1992年) に準じて、アフリカツメガエルの卵母細胞に注入し、この卵母細胞について、基質としてグルタル酸を用いる取り込み実験を行った。実

験には、放射能ラベルした基質 (^{14}C -グルタル酸) を用いた。その結果、ナトリウム依存性にグルタル酸の取り込みが認められ、クローニングした cDNA がラットジカルボン酸塩トランスポーター遺伝子のものであることが確認できた (図 1)。

【0043】

(2) ラット腎臓有機陰イオントランスポーター OAT1 のクローニング

金井らの方法 (Kanai and Hediger, Nature, 第360巻, 第467-471頁, 1992年) に準じて、発現クローニング法により以下のようにして行った。

【0044】

ゲル電気泳動によりラット腎臓ポリ (A) $^{+}$ RNA 400 μg を分画した。

【0045】

分画により得られた各画分を、上記 (1) で得られたラットジカルボン酸塩トランスポーターの cRNA と共に卵母細胞に注入した。卵母細胞は、基質として 1 mM グルタル酸を含むナトリウム uptake 溶液 [96 mM 塩化ナトリウム、2 mM 塩化カリウム、1.8 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム、5 mM HEPES、pH 7.4] 中にて予め 2 時間前培養したものをを用いた。

【0046】

RNA 注入した卵母細胞について、基質としてパラアミノ馬尿酸塩 (以下 PAH と略す。) を用い、基質の取り込み実験を金井らの方法 (Kanai and Hediger, Nature, 第360巻, 第467-471頁, 1992年) に準じて、以下のようにして行った。基質として ^{14}C -PAH (50 μM) を含みグルタル酸を含まないナトリウム uptake 溶液中にて 1 時間卵母細胞を培養して、細胞内に取り込まれた放射能のカウントで基質の取り込み率を測定した。なお、この系において、ラット腎臓のポリ (A) $^{+}$ RNA (mRNA) だけを注入した卵母細胞、および、ラットジカルボン酸塩トランスポーターの cRNA のみを注入した卵母細胞では、PAH の取り込みは見られなかったのに対して、ラット腎臓のポリ (A) $^{+}$ RNA とラットジカルボン酸塩トランスポーターの cRNA の両者を注入した卵母細胞では PAH の取り込みが認められることを確認した (図 2)。

【0047】

分画により得られた各RNA画分のうちRNAを注入した卵母細胞が、最も高いPAHの取り込み率を示した画分を選択した。この画分のポリ(A)⁺RNA (1.8~2.4 kb) について、cDNA合成及びプラスミドクローニング用キット (商品名: Superscript Plasmid System、ギブコ社製) を使用して、cDNAをライブラリーを作成した。これらDNAはプラスミドpSPORT1 (ギブコ社製) の制限酵素SalI及びNotI認識部位に組み込み、得られた組換えプラスミドDNAを大腸菌DH10B株のコンピテントセル (商品名: Electro Max DH10B Competent cell、ギブコBRL社製) に導入した。得られた形質転換体をニトロセルロース膜上で培養し、1プレート当たり約500個のコロニーが得られた。これらコロニーから、プラスミドDNAを調製し、これらを制限酵素NotIで切断した。得られたDNAを用いて、in vitro転写により、キャップ化されたcRNAを合成した。

【0048】

得られたcRNA (約10 ng) を、上記(1) で得たラットジカルボン酸塩トランスポーターのcRNA (2 ng) と共に卵母細胞へ注入した。これら卵母細胞について、前記と同様にして、PAHの取り込み実験を行うことにより陽性クローンのスクリーニングを行った。スクリーニングに際しては、複数のクローンから抽出したDNAをプールしたグループについて調べ、あるグループでパラアミノ馬尿酸の取り込みが確認された場合、さらにそれを複数のグループに分割し、さらにスクリーニングを行った。

【0049】

スクリーニングの結果、8000個のクローンから1つの陽性クローン (cRNAを注入した卵母細胞で基質の取り込みが認められるクローン) が単離された。

【0050】

得られたクローン、すなわち、ラットジカルボン酸塩トランスポーターOAT1のcDNAを含むクローンについて、塩基配列決定のための欠失クローン作製用キット (商品名: Kilo-Sequense Deletion Kit、宝酒造社製)、合成プライマ

一、塩基配列決定用キット（商品名：Sequenase ver.2.0、アマシャム社製）を用いてダイデオキシ法により、cDNAの塩基配を決定した。

【0051】

これにより、ラットジカルボン酸塩トランスポーターOAT1遺伝子のcDNAの塩基配列が得られた。また、cDNAの塩基配列を常法により解析して、cDNA上の翻訳領域とそこにコードされるOAT1のアミノ酸配列を決定した。

【0052】

これら配列を、後記配列表の配列番号1に示した。

【0053】

Kyte-Doolittle hydropathy analysis（疎水性プロット）により、OAT1のアミノ酸配列を解析した結果、図3に示したように、12個の膜貫通領域（membrane-spanning domains）が予測された。また、5つの糖鎖付加部位が最初の親水性ループに予測された。6番目と7番目の膜貫通領域（transmembrane domains）の親水基のループにプロテインキナーゼC依存性のリン酸化部位と考えられる部位が4つあった。

【0054】

（3）種々の組織におけるOAT1遺伝子の発現（ノーザンブローディングによる解析）

ラットOAT1遺伝子の全長cDNAを ^{32}P -dCTPでラベルし、これをプローブとして用いて、ラットの種々の組織から抽出したRNAに対してノーザンブローディングを以下のように行なった。3 μg のポリ(A) $^{+}$ RNAを1%アガロース/ホルムアルデヒドゲルで電気泳動したのち、ニトロセルロースフィルターに転写した。このフィルターを42℃で、 ^{32}P -dCTPでラベルした全長のOAT1 cDNAを含んだハイブリダイゼーション液で1晩ハイブリダイゼーションを行った。フィルターを、65℃にて、0.1% SDSを含む0.1x SSCで洗浄した。

【0055】

ノーザンブローディングの結果（図4）、腎臓において、2.4kb付近と3.9kbと4.2kbに相当する2つのバンドが検出され、発現が認められた。腎臓の皮質と髄質

外層ではOAT1 mRNAの発現量が多く、髄質内層では少なかった。

【0056】

さらに長時間の感光で、脳において2.4kb付近にかすかなバンドが検出されたが、その他の組織ではバンドは検出されず、発現は認められなかった。

【0057】

(4) 腎組織におけるOAT1遺伝子の発現 (In situハイブリダイゼーションによる解析)

In situ ハイブリダイゼーションを以下のように行った。すなわち、ラットの腎臓を4% パラホルムアルデヒドで灌流することにより固定した後、これを細切り、4% パラホルムアルデヒドでさらに固定した。得られたラット腎臓を5 μ mの厚さに薄切し、得られた切片を、in situハイブリダイゼーションに用いた。

【0058】

全長のOAT1 cDNAから、T7若しくはT3 RNAポリメラーゼを用いて、³⁵SでラベルしたセンスcRNAとアンチセンスcRNAを合成し、プローブとして用いた。切片をハイブリダイゼーション液で一晩プローブでハイブリダイゼーションを行ない、0.1 \times SSCで30分、37℃にて洗浄した。

【0059】

In situ ハイブリダイゼーションの結果、ラット腎臓の層状部位では、OAT1 mRNAは腎臓の皮質と髄質外層、特に皮質の髄放線の部分で発現することが示された。髄質内層では発現は検出されなかった。この結果は、有機陰イオントランスポーターOAT1が近位尿細管の中間部分で最も多く発現されることを示している。

【0060】

実施例2 有機陰イオントランスポーターOAT1の特徴づけ

(1) OAT1の輸送活性におけるグルタル酸の影響

ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験においてグルタル酸とのプレインキュベーションの影響を調べた。

【0061】

PAHの取り込み実験は、前記実施例1(2)記載方法に準じ、以下のように行った。すなわち、ラットOAT1遺伝子cRNAもしくは、ラットOAT1遺伝子cRNAとラットNaDC-1cRNAを注入した卵母細胞を、1mM グルタル酸添加もしくは無添加のナトリウム uptake solution中で2時間前培養したあと、 ^{14}C -PAHを添加して室温で1時間培養し放射能でラベルされた基質の取り込みを測定した。

【0062】

その結果(図5)、PAHの取り込みは、1mM グルタル酸で卵母細胞を前処置することによって増加した。また、ラットジカルボン酸塩トランスポーターとOAT1が発現している卵母細胞をグルタル酸で前処置すると、さらに ^{14}C -パラアミノ馬尿酸塩の取り込みの増加が見られた。この結果に示されるグルタル酸の効果は、PAH取り込みの細胞内ジカルボン酸濃度依存性を示しており、OAT1が有機アニオンとジカルボン酸の交換輸送体であると考えられた。

【0063】

(2) OAT1の輸送活性の塩依存性

ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において培地に添加する塩の影響を調べた。

【0064】

PAHの取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)記載方法に準じて実施した。但し、uptake solutionは、塩として塩化コリンイオンを添加した場合の影響をみる場合には、ナトリウム uptake solutionにかえて、塩化コリン uptake solution (96mM 塩化ナトリウムのナトリウム solutionを96 mM 塩化コリンに変えてpHを7.4に調節した)を用いた。

【0065】

その結果(図6)、細胞外のナトリウムをコリンと置換しても、PAH取り込みに何ら影響を与えなかった。このことから、OAT1はナトリウムイオン非依存性に働く、トランスポーターであることが示された。

【0066】

(3) OAT1のミカエリス-メンテンの動力学試験

有機陰イオントランスポーターのミカエリス-メンテンの動力学試験を行った。基質PAHの濃度の違いによるPAHの取り込み率の変化を調べることににより、有機陰イオントランスポーターのミカエリス-メンテンの動力学試験を行った。

【0067】

PAHの取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)記載方法に準じて実施した。但し、 ^{14}C -PAH取り込みは3分間測定した。その結果(図7)、 K_m 値は約 $14.3 \pm 2.9 \mu\text{M}$ であった。

【0068】

この K_m 値は、既にin vivo系報告されている基底側の有機アニオントランスポート系の K_m 値($80 \mu\text{M}$) (Ulrich ら、Am. J. Physiol. 第254巻、F453-462頁、1988年)と似ていた。

【0069】

(4) OAT1の基質選択性(薬物添加による阻害試験)

ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において、系への各種薬物添加の影響を調べた。

【0070】

PAHの取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)記載方法に準じて実施した。但し、ナトリウム uptake solutionを用い、2mMの各種化合物(非標識)の存在下及び非存在下で、PAHの取り込みを測定した。

【0071】

その結果(図8)、構造的に無関係の薬物の添加で、cis-阻害効果が観察された。セファロリジン(β -ラクタム系抗生物質)、ナリジクス酸(オールドキノロン)、フロセミドとエタクリン酸(利尿薬)、インドメタシン(非ステロイド系抗炎症剤)、プロベネシド(尿酸排泄薬)、バルプロ酸(抗てんかん薬)はOAT-1を介した ^{14}C -パラアミノ馬尿酸塩の取り込みを強く阻害した($85\% >$)。抗腫瘍薬であるメトトレキサートはPAHの取り込みを中等度に阻

害した。プロスタグランジンE₂、c-AMP、c-GMP、尿酸といった内因性化合物もPAHの取り込みを阻害した。

【0072】

(5) OAT1の基質選択性(各種陰イオン性物質を基質とする取り込み試験)
各種陰イオン性物質を基質として、OAT1による取り込みを調べた。

【0073】

PAHの取り込み実験は、ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞を用い、前記(1)記載方法に準じて実施した。但し、基質としては、¹⁴C-PAHにかえて、放射能でラベルされた各種の化合物を用いた。

【0074】

その結果(図9)、メトキサレート(³H標識物)、c-AMP(³H標識物)、c-GMP(³H標識物)、プロスタグランジンE₂(³H標識物)、尿酸(¹⁴C標識物)、 α -ケトグルタル酸(¹⁴C標識物)を基質とした場合に、卵母細胞への取り込みが認められた。一方、TEA(¹⁴C標識物)とタウロコール酸では取り込みを示さなかった。

【0075】

実施例3 ヒト有機陰イオントランスポーターのクローニング

実施例1の(2)にて得たラットOAT1遺伝子のcDNA断片を標識し、これをプローブとして用いて、ヒトcDNAライブラリーをスクリーニングした。ヒトcDNAライブラリーは、遺伝子源としてヒト腎ポリ(A)⁺RNA(クロンテック社製)を用いて作製したヒトcDNAライブラリーを用いた。

【0076】

また、得られた陽性クローン、すなわち、ヒト有機陰イオントランスポーター(ヒトOAT1)cDNAを含むクローンについて、実施例1と同様にして、塩基配列を決定し、得られたcDNAの塩基配列を常法により解析して、cDNA上の翻訳領域とそこにコードされるヒトOAT1のアミノ酸配列を決定した。

【0077】

これらヒトOAT1の配列を、後記配列表の配列番号2に示した。

【0078】

ラットOAT1とヒトOAT1とのホモロジーは、アミノ酸レベルで約85%であった。また、cDNAレベルでのホモロジーは、約79%であった。

【0079】

【発明の効果】

本発明の有機陰イオントランスポーターOAT1およびその遺伝子は、薬物排出や薬物と薬物の相互作用のインビトロでの分析など、薬物動態や毒物動態の分子レベルでの解明に有用と考えられる。また、 β ラクタム系抗生物質、利尿薬、非ステロイド系抗炎症薬のような腎不全の原因となる多くの薬物が、OAT1によって輸送され、薬物が腎毒性を引き起こす原因はOAT1に起因する蓄積性による可能性が示唆されることから、OAT1を用いて腎毒性を防止するための薬物をスクリーニングする方法を開発し得ると考えられる。

【0080】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：2294

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ラット

配列

```
GCTCCAGCAG ACCCTGAAAG CTGAGCTGTC CAGACCCCCG AAGTGAAGAA AAGAGGCGAG 60
GGCAAGGGAG GGCCAGAACC GAGGGAGAGA GAAAGGAGGG GCAGCCCACC AGCCCCTGT 120
CCTGCCACAG AACCGGCTCA GCTCCAGCTC CAGGAGTCAC TCAGCTGCAG AGGCAGTGGC 180
AGCCCCACTC CTCAGGCAAA GGGCAGCAGA CAGACAGACA GAGGTCCTAG GACTGGAGGT 240
CCTCAGTCAT TGACCACTCA GCCTGGCCCCA GCCCC 275
ATG GCC TTC AAT GAC CTC CTG AAA CAG GTG GGG GGC GTC GGA CGC 320
```

Met Ala Phe Asn Asp Leu Leu Lys Gln Val Gly Gly Val Gly Arg	
1 5 10 15	
TTC CAG TTG ATC CAG GTC ACC ATG GTG GTT GCT CCC CTA CTG CTG	365
Phe Gln Leu Ile Gln Val Thr Met Val Val Ala Pro Leu Leu Leu	
20 25 30	
ATG GCT TCC CAC AAC ACC TTG CAG AAC TTC ACT GCC GCT ATC CCC	410
Met Ala Ser His Asn Thr Leu Gln Asn Phe Thr Ala Ala Ile Pro	
35 40 45	
CCT CAT CAC TGC CGC CCA CCT GCC AAT GCC AAT CTC AGC AAA GAT	455
Pro His His Cys Arg Pro Pro Ala Asn Ala Asn Leu Ser Lys Asp	
50 55 60	
GGA GGT CTG GAG GCC TGG CTG CCC CTG GAC AAG CAA GGA CAA CCC	500
Gly Gly Leu Glu Ala Trp Leu Pro Leu Asp Lys Gln Gly Gln Pro	
65 70 75	
GAA TCG TGC CTC CGC TTT ACT TCC CCC CAG TGG GGA CCA CCC TTT	545
Glu Ser Cys Leu Arg Phe Thr Ser Pro Gln Trp Gly Pro Pro Phe	
80 85 90	
TAC AAT GGC ACA GAA GCC AAT GGC ACC AGA GTC ACA GAG CCC TGC	590
Tyr Asn Gly Thr Glu Ala Asn Gly Thr Arg Val Thr Glu Pro Cys	
95 100 105	
ATT GAT GGC TGG GTC TAT GAC AAC AGC ACC TTC CCT TCA ACC ATC	635
Ile Asp Gly Trp Val Tyr Asp Asn Ser Thr Phe Pro Ser Thr Ile	
110 115 120	
GTG ACT GAG TGG AAC CTT GTG TGC TCT CAT CGG GCT TTC CGC CAG	680
Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Ser His Arg Ala Phe Arg Gln	
125 130 135	
CTG GCC CAG TCC CTG TAC ATG GTG GGA GTG CTG CTG GGA GCC ATG	725
Leu Ala Gln Ser Leu Tyr Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Met	
140 145 150	

GTG TTT GGC TAC CTG GCG GAC AGG CTG GGC CGC CGG AAG GTG CTG	770
Val Phe Gly Tyr Leu Ala Asp Arg Leu Gly Arg Arg Lys Val Leu	
155 160 165	
ATC TTG AAC TAC CTG CAG ACA GCT GTG TCG GGA ACC TGT GCA GCC	815
Ile Leu Asn Tyr Leu Gln Thr Ala Val Ser Gly Thr Cys Ala Ala	
170 175 180	
TAT GCA CCC AAC TAT ACT GTC TAC TGC GTT TTC CGG CTC CTC TCG	860
Tyr Ala Pro Asn Tyr Thr Val Tyr Cys Val Phe Arg Leu Leu Ser	
185 190 195	
GGC ATG TCT TTG GCT AGC ATT GCA ATC AAC TGC ATG ACA CTA AAT	905
Gly Met Ser Leu Ala Ser Ile Ala Ile Asn Cys Met Thr Leu Asn	
200 205 210	
GTG GAA TGG ATG CCT ATC CAC ACC CGT GCC TAT GTG GGC ACC TTG	950
Val Glu Trp Met Pro Ile His Thr Arg Ala Tyr Val Gly Thr Leu	
215 220 225	
ATT GGC TAT GTC TAC AGC CTG GGC CAG TTC CTC CTG GCT GGC ATC	995
Ile Gly Tyr Val Tyr Ser Leu Gly Gln Phe Leu Leu Ala Gly Ile	
230 235 240	
GCC TAT GCT GTG CCC CAC TGG CGC CAC CTG CAG CTT GTG GTC TCT	1040
Ala Tyr Ala Val Pro His Trp Arg His Leu Gln Leu Val Val Ser	
245 250 255	
GTG CCT TTT TTC ATT GCC TTC ATC TAC TCT TGG TTC TTC ATT GAG	1085
Val Pro Phe Phe Ile Ala Phe Ile Tyr Ser Trp Phe Phe Ile Glu	
260 265 270	
TCA GCC CGC TGG TAC TCC TCC TCA GGA AGG CTG GAC CTC ACC CTC	1130
Ser Ala Arg Trp Tyr Ser Ser Ser Gly Arg Leu Asp Leu Thr Leu	
275 280 285	
CGA GCC CTG CAG AGA GTG GCC CGG ATC AAT GGG AAA CAA GAA GAA	1175
Arg Ala Leu Gln Arg Val Ala Arg Ile Asn Gly Lys Gln Glu Glu	

290	295	300	
GGG GCT AAG CTA AGT ATA GAG GTG CTC CGG ACC AGC CTG CAG AAG			1220
Gly Ala Lys Leu Ser Ile Glu Val Leu Arg Thr Ser Leu Gln Lys			
305	310	315	
GAA CTG ACT CTA AGC AAA GGC CAA GCC TCA GCC ATG GAG CTG CTG			1265
Glu Leu Thr Leu Ser Lys Gly Gln Ala Ser Ala Met Glu Leu Leu			
320	325	330	
CGC TGC CCC ACC CTT CGA CAC CTC TTC CTC TGT CTC TCC ATG CTG			1310
Arg Cys Pro Thr Leu Arg His Leu Phe Leu Cys Leu Ser Met Leu			
335	340	345	
TGG TTT GCC ACT AGC TTT GCC TAC TAC GGG CTG GTC ATG GAC CTG			1355
Trp Phe Ala Thr Ser Phe Ala Tyr Tyr Gly Leu Val Met Asp Leu			
350	355	360	
CAG GGC TTT GGG GTC AGC ATG TAC CTT ATC CAG GTG ATT TTC GGT			1400
Gln Gly Phe Gly Val Ser Met Tyr Leu Ile Gln Val Ile Phe Gly			
365	370	375	
GCC GTG GAC CTG CCT GCC AAG TTT GTA TGC TTC CTA GTC ATC AAC			1445
Ala Val Asp Leu Pro Ala Lys Phe Val Cys Phe Leu Val Ile Asn			
380	385	390	
TCC ATG GGG CGC CGG CCT GCA CAG ATG GCC TCC CTG CTG CTG GCA			1490
Ser Met Gly Arg Arg Pro Ala Gln Met Ala Ser Leu Leu Leu Ala			
395	400	405	
GGC ATC TGC ATC CTG GTG AAT GGC ATA ATA CCG AAG AGC CAT ACG			1535
Gly Ile Cys Ile Leu Val Asn Gly Ile Ile Pro Lys Ser His Thr			
410	415	420	
ATC ATT CGC ACC TCC CTG GCT GTG CTA GGG AAG GGC TGC CTG GCT			1580
Ile Ile Arg Thr Ser Leu Ala Val Leu Gly Lys Gly Cys Leu Ala			
425	430	435	
TCC TCT TTC AAC TGC ATC TTC CTG TAC ACC GGA GAG CTG TAC CCC			1625

Ser Ser Phe Asn Cys Ile Phe Leu Tyr Thr Gly Glu Leu Tyr Pro	
440 445 450	
ACA GTG ATT CGG CAG ACA GGC CTG GGC ATG GGC AGC ACC ATG GCC	1670
Thr Val Ile Arg Gln Thr Gly Leu Gly Met Gly Ser Thr Met Ala	
455 460 465	
CGG GTG GGC AGC ATT GTG AGC CCG CTG GTG AGC ATG ACT GCA GAG	1715
Arg Val Gly Ser Ile Val Ser Pro Leu Val Ser Met Thr Ala Glu	
470 475 480	
TTC TAC CCC TCC ATG CCT CTC TTC ATC TTC GGC GCT GTC CCT GTG	1760
Phe Tyr Pro Ser Met Pro Leu Phe Ile Phe Gly Ala Val Pro Val	
485 490 495	
GTC GCC AGT GCT GTC ACT GCC CTG CTG CCA GAG ACC TTG GGC CAG	1805
Val Ala Ser Ala Val Thr Ala Leu Leu Pro Glu Thr Leu Gly Gln	
500 505 510	
CCG CTG CCA GAT ACA GTG CAG GAC CTG AAG AGC AGG AGC AGA GGA	1850
Pro Leu Pro Asp Thr Val Gln Asp Leu Lys Ser Arg Ser Arg Gly	
515 520 525	
AAG CAG AAT CAA CAG CAG CAG GAA CAG CAG AAG CAG ATG ATG CCG	1895
Lys Gln Asn Gln Gln Gln Gln Glu Gln Gln Lys Gln Met Met Pro	
530 535 540	
CTC CAG GCC TCA ACA CAA GAG AAG AAT GGA CTT	1928
Leu Gln Ala Ser Thr Gln Glu Lys Asn Gly Leu	
545 550 551	
TGAGAACGGA AGGGCTTCAC ACAGCACTAA AGGGAGTGGG GTTCTACAGG TCCTGCCGTC	1988
TACATGAGGA GGGGGAGTGA GTAGAGGGAC TGGACCATCC AAATGTGGAG GCTGCCATTC	2048
AGAGAAATCC CTCCCCAAAG GTCATGTCAG TAGACCCACT AGGAACAAAA GCTCTGACTA	2108
TGTGCAGCTT CTTAAGCAGA ATGTTCTCGT CACCGGCCAT CTTCTGCTC ATGGTCACTC	2168
CGCCACCTCC AGGACCTTGC AAAGAATCTC AGACAATTAA ATGAATCTCT TCTAAAAAAA	2228
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	2288

AAAAAA

2294

。

【0081】

配列番号：2

配列の長さ：2171

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：ヒト

配列

GAAAGCTGAG CTGCCCTGAC CCCCAAAGTG AGGAGAAGCT GCAAGGGAAA AGGGAGGGAC	60
AGATCAGGGA GACCGGGGAA GAAGGAGGAG CAGCCAAGGA GGCTGCTGTC CCCCCACAGA	120
GCAGCTCGGA CTCAGCTCCC GGAGCAACCC AGCTGCGGAG GCAACGGCAG TGCTGCTCCT	180
CCAGCGAAGG ACAGCAGGCA GGCAGACAGA CAGAGGTCCT GGGACTGGAA GGCCTCAGCC	240
CCCAGCCACT GGGCTGGGCC TGGCCCA	267
ATG GCC TTT AAT GAC CTC CTG CAG CAG GTG GGG GGT GTC GGC CGC	312
Met Ala Phe Asn Asp Leu Leu Gln Gln Val Gly Gly Val Gly Arg	
1 5 10 15	
TTC CAG CAG ATC CAG GTC ACC CTG GTG GTC CTC CCC CTG CTC CTG	357
Phe Gln Gln Ile Gln Val Thr Leu Val Val Leu Pro Leu Leu Leu	
20 25 30	
ATG GCT TCT CAC AAC ACC CTG CAG AAC TTC ACT GCT GCC ATC CCT	402
Met Ala Ser His Asn Thr Leu Gln Asn Phe Thr Ala Ala Ile Pro	
35 40 45	
ACC CAC CAC TGC CGC CCG CCT GCC GAT GCC AAC CTC AGC AAG AAC	447
Thr His His Cys Gly Pro Pro Ala Asp Ala Asn Leu Ser Lys Asn	
50 55 60	

GGG GGG CTG GAG GTC TGG CTG CCC CGG GAC AGG CAG GGG CAG CCT	492
Gly Gly Leu Glu Val Trp Leu Pro Arg Asp Arg Gln Gly Gln Pro	
65 70 75	
GAG TCC TGC CTC CGC TTC ACC TCC CCG CAG TGG GGA CTG CCC TTT	537
Glu Ser Cys Leu Arg Phe Thr Ser Pro Gln Trp Gly Leu Pro Phe	
80 85 90	
CTC AAT GGC ACA GAA GCC AAT GGC ACA GGG GCC ACA GAG CCC TGC	582
Leu Asn Gly Thr Glu Ala Asn Gly Thr Gly Ala Thr Glu Pro Cys	
95 100 105	
ACC GAT GGC TGG ATC TAT GAC AAC AGC ACC TTC CCA TCT ACC ATC	627
Thr Asp Gly Trp Ile Tyr Asp Asn Ser Thr Phe Pro Ser Thr Ile	
110 115 120	
GTG ACT GAG TGG GAC CTT GTG TGC TCT CAC AGG GCC CTA CGC CAG	672
Val Thr Glu Trp Asp Leu Val Cys Ser His Arg Ala Leu Arg Gln	
125 130 135	
CTG GCC CAG TCC TTG TAC ATG GTG GGG GTG CTG CTC GGA GCC ATG	717
Leu Ala Gln Ser Leu Tyr Met Val Gly Val Leu Leu Gly Ala Met	
140 145 150	
GTG TTC GGC TAC CTT GCA GAC AGG CTA GGC CGC CGG AAG GTA CTC	762
Val Phe Gly Tyr Leu Ala Asp Arg Leu Gly Arg Arg Lys Val Leu	
155 160 165	
ATC TTG AAC TAC CTG CAG ACA GCT GTG TCA GGG ACC TGC GCA GCC	807
Ile Leu Asn Tyr Leu Gln Thr Ala Val Ser Gly Thr Cys Ala Arg	
170 175 180	
TTC GCA CCC AAC TTC CCC ATC TAC TGC GCC TTC CGG CTC CTC TCG	852
Phe Ala Pro Asn Phe Pro Ile Tyr Cys Ala Phe Arg Leu Leu Ser	
185 190 195	
GGC ATG GCT CTG GCT GGC ATC TCC CTC AAC TGC ATG ACA CTG AAT	897
Gly Met Ala Leu Ala Gly Ile Ser Leu Asn Cys Met Thr Leu Asn	

200	205	210	
GTG GAG TGG ATG CCC ATT CAC ACA CGG GCC TGC GTG GGC ACC TTG			942
Val Glu Trp Met Pro Ile His Thr Arg Ala Cys Val Gly Thr Leu			
215	220	225	
ATT GGC TAT GTC TAC AGC CTG GGC CAG TTC CTC CTG GCT GGT GTG			987
Ile Gly Tyr Val Tyr Ser Leu Gly Gln Phe Leu Leu Ala Gly Val			
230	235	240	
GCC TAC GCT GTG CCC CAC TGG CGC CAC CTG CAG CTA CTG GTC TCT			1032
Ala Tyr Ala Val Pro His Trp Arg His Leu Gln Leu Leu Val Ser			
245	250	255	
GCG CCT TTT TTT GCC TTC TTC ATC TAC TCC TGG TTC TTC ATT GAG			1077
Ala Pro Phe Phe Ala Phe Phe Ile Tyr Ser Trp Phe Phe Ile Glu			
260	265	270	
TCG GCC CGC TGG CAC TCC TCC TCC GGG AGG CTG GAC CTC ACC CTG			1122
Ser Ala Arg Trp His Ser Ser Ser Gly Arg Leu Asp Leu Thr Leu			
275	280	285	
AGG GCC CTG CAG AGA GTC GCC CGG ATC AAT GGG AAG CGG GAA GAA			1167
Arg Ala Leu Gln Arg Val Ala Arg Ile Asn Gly Lys Arg Glu Glu			
290	295	300	
GGA GCC AAA TTG AGT ATG GAG GTA CTC CGG GCC AGT CTG CAG AAG			1212
Gly Ala Lys Leu Ser Met Glu Val Leu Arg Ala Ser Leu Gln Lys			
305	310	315	
GAG CTG ACC ATG GGC AAA GGC CAG GCA TCG GCC ATG GAG CTG CTG			1257
Glu Leu Thr Met Gly Lys Gly Gln Ala Ser Ala Met Glu Leu Leu			
320	325	330	
CGC TGC CCC ACC CTC CGC CAC CTC TTC CTC TGC CTC TCC ATG CTG			1302
Arg Cys Pro Thr Leu Arg His Leu Phe Leu Cys Leu Ser Met Leu			
335	340	345	
TGG TTT GCC ACT AGC TTT GCA TAC TAT GGG CTG GTC ATG GAC CTG			1347

Trp Phe Ala Thr Ser Phe Ala Tyr Tyr Gly Leu Val Met Asp Leu	
350 355 360	
CAG GGC TTT GGA GTC AGC ATC TAC CTA ATC CAG GTG ATC TTT GGT	1392
Gln Gly Phe Gly Val Ser Ile Tyr Leu Ile Gln Val Ile Phe Gly	
365 370 375	
GCT GTG GAC CTG CCT GCC AAG CTT GTG GGC TTC CTT GTC ATC AAC	1437
Ala Val Asp Leu Pro Ala Lys Leu Val Gly Phe Leu Val Ile Asn	
380 385 390	
TCC CTG GGT CGC CGG CCT GCC CAG ATG GCT GCA CTG CTG CTG GCA	1482
Ser Leu Gly Arg Arg Pro Ala Gln Met Ala Ala Leu Leu Leu Ala	
395 400 405	
GGC ATC TGC ATC CTG CTC AAT GGG GTG ATA CCC CAG GAC CAG TCC	1527
Gly Ile Cys Ile Leu Leu Asn Gly Val Ile Pro Gln Asp Gln Ser	
410 415 420	
ATT GTC CGA ACC TCT CTT GCT GTG CTG GGG AAG GGT TGT CTG GCT	1572
Ile Val Arg Thr Ser Leu Ala Val Leu Gly Lys Gly Cys Leu Ala	
425 430 435	
GCC TCC TTC AAC TGC ATC TTC CTG TAT ACT GGG GAA CTG TAT CCC	1617
Ala Ser Phe Asn Cys Ile Phe Leu Tyr Thr Gly Glu Leu Tyr Pro	
440 445 450	
ACA ATG ATC CGG CAG ACA GGC ATG GGA ATG GGC AGC ACC ATG GCC	1662
Thr Met Ile Arg Gln Thr Gly Met Gly Met Gly Ser Thr Met Ala	
455 460 465	
CGA GTG GGC AGC ATC GTG AGC CCA CTG GTG AGC ATG ACT GCC GAG	1707
Arg Val Gly Ser Ile Val Ser Pro Leu Val Ser Met Thr Ala Glu	
470 475 480	
CTC TAC CCC TCC ATG CCT CTC TTC ATC TAC GGT GCT GTT CCT GTG	1752
Leu Tyr Pro Ser Met Pro Leu Phe Ile Tyr Gly Ala Val Pro Val	
485 490 495	

GCC GCC AGC GCT GTC ACT GTC CTC CTG CCA GAG ACC CTG GGC CAG	1797
Ala Ala Ser Ala Val Thr Val Leu Leu Pro Glu Thr Leu Gly Gln	
500 505 510	
CCA CTG CCA GAC ACG GTG CAG GAC CTG GAG AGC AGG TGG GCC CCC	1842
Pro Leu Pro Asp Thr Val Gln Asp Leu Glu Ser Arg Trp Ala Pro	
515 520 525	
ACT CAG AAA GAA GCA GGG ATA TAT CCC AGG AAA GGG AAA CAG ACG	1887
Thr Gln Lys Glu Ala Gly Ile Tyr Pro Arg Lys Gly Lys Gln Thr	
530 535 540	
CGA CAG CAA CAA GAG CAC CAG AAG TAT ATG GTC CCA CTG CAG GCC	1932
Arg Gln Gln Gln Glu His Gln Lys Tyr Met Val Pro Leu Gln Ala	
545 550 555	
TCA GCA CAA GAG AAG AAT GGA CTC	1956
Ser Ala Gln Glu Lys Asn Gly Leu	
560 563	
TGAGGACTGA GAAGGGGCCT TACAGAACCC TAAAGGGAGG GAAGGTCCTA CAGGTCTCCG	2016
GCCACCCACA CAAGGAGGAG GAAGAGGAAA TGGTGACCCA AGTGTGGGGG TTGTGGTTCA	2076
GGAAAGCATC TTCCCAGGGG TCCACCTCCC TTTATAAACCC CCACCAGAAC CACATCATT	2136
AAAGGTTTGA CTGCGAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA	2171

【図面の簡単な説明】

【図1】 ラットのナトリウム依存性ジカルボン酸塩トランスポーター（NaDC-1）遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるグルタル酸の取り込み実験の結果を示す図。

【図2】 ラット腎組織由来mRNA及び／又はラットNaDC-1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験の結果を示す図。

【図3】 ラット有機陰イオントランスポーターOAT1の疎水性プロットを示す図。

【図4】 ラットの各臓器組織におけるOAT1遺伝子mRNAの発現をノーザンブロッティングにより解析した結果を示した電気泳動の写真。

【図5】 ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験においてグルタル酸とのプレインキュベーションの影響を調べた結果を示す図。

【図6】 ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において添加する塩の影響を調べた結果を示す図。

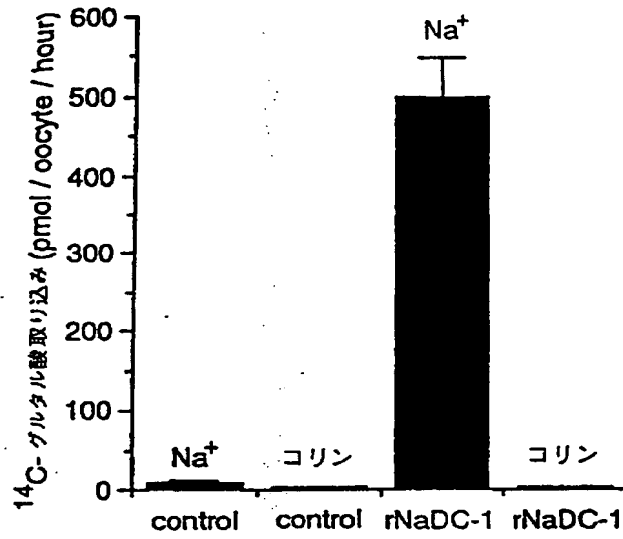
【図7】 ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において基質PAHの濃度の影響を調べた結果を示す図。

【図8】 ラットOAT1遺伝子cRNAを注入した卵母細胞によるPAHの取り込み実験において、系への各種薬物添加の影響を調べた結果を示す図。

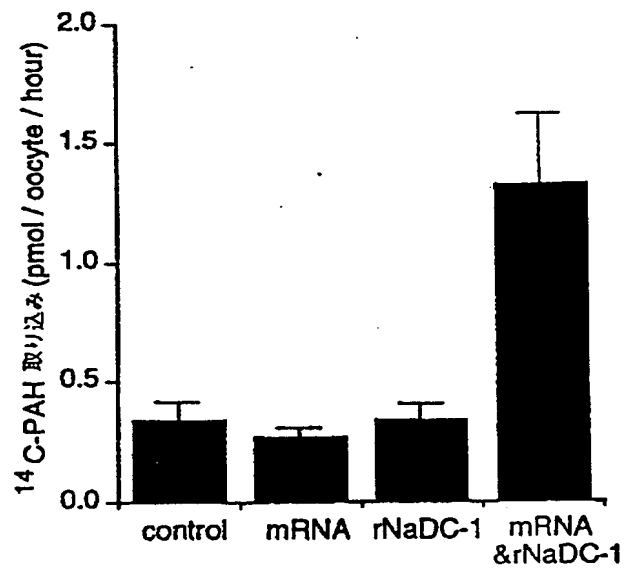
【図9】 基質として各種薬物を用いた場合の、ラットOAT1遺伝子のcRNAを注入した卵母細胞による取り込み実験の結果を示す図。

【書類名】 図面

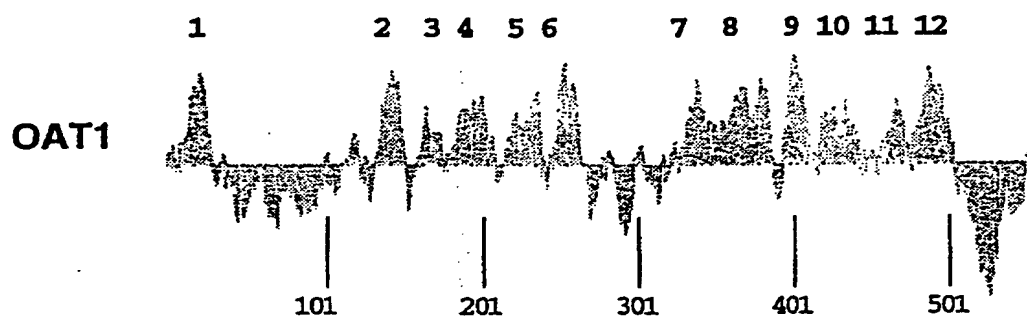
【図 1】



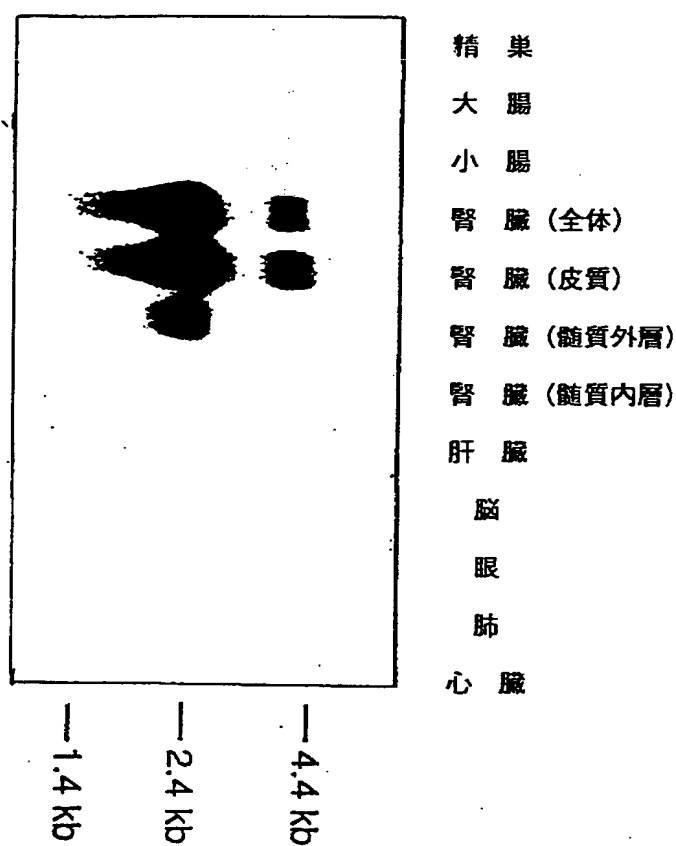
【図 2】



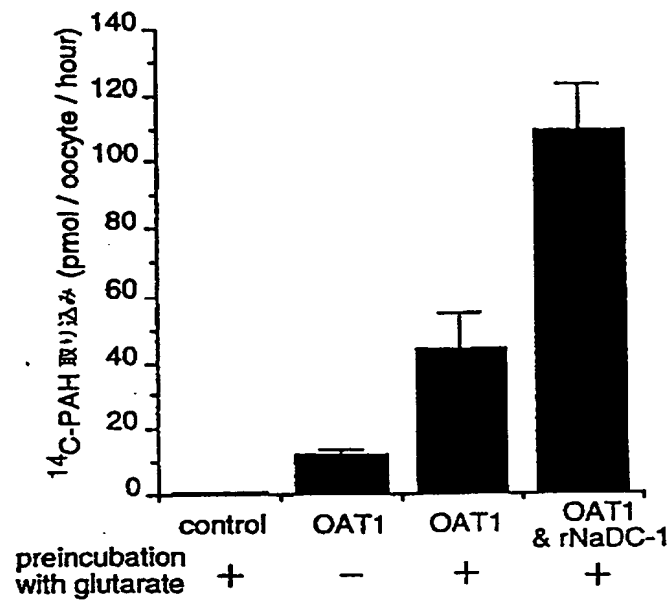
【図3】



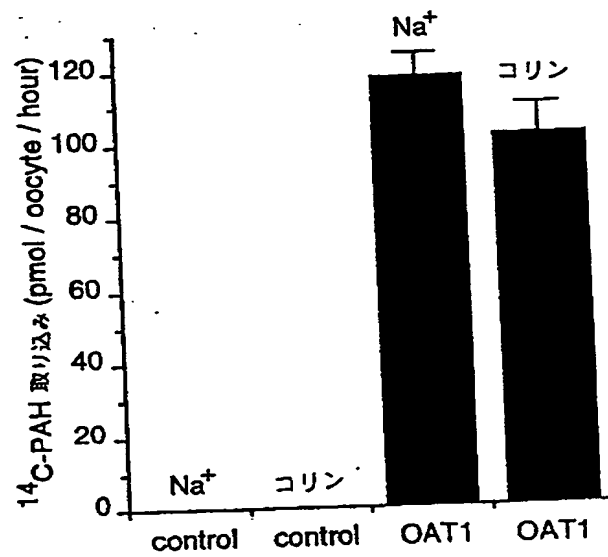
【図4】



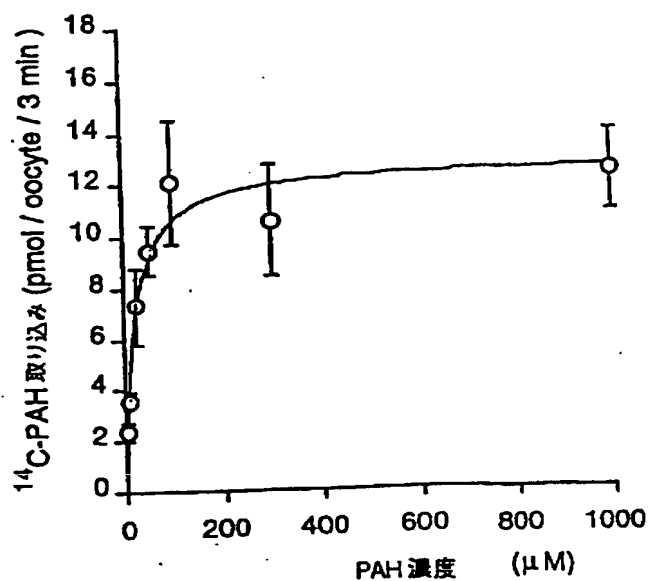
【図5】



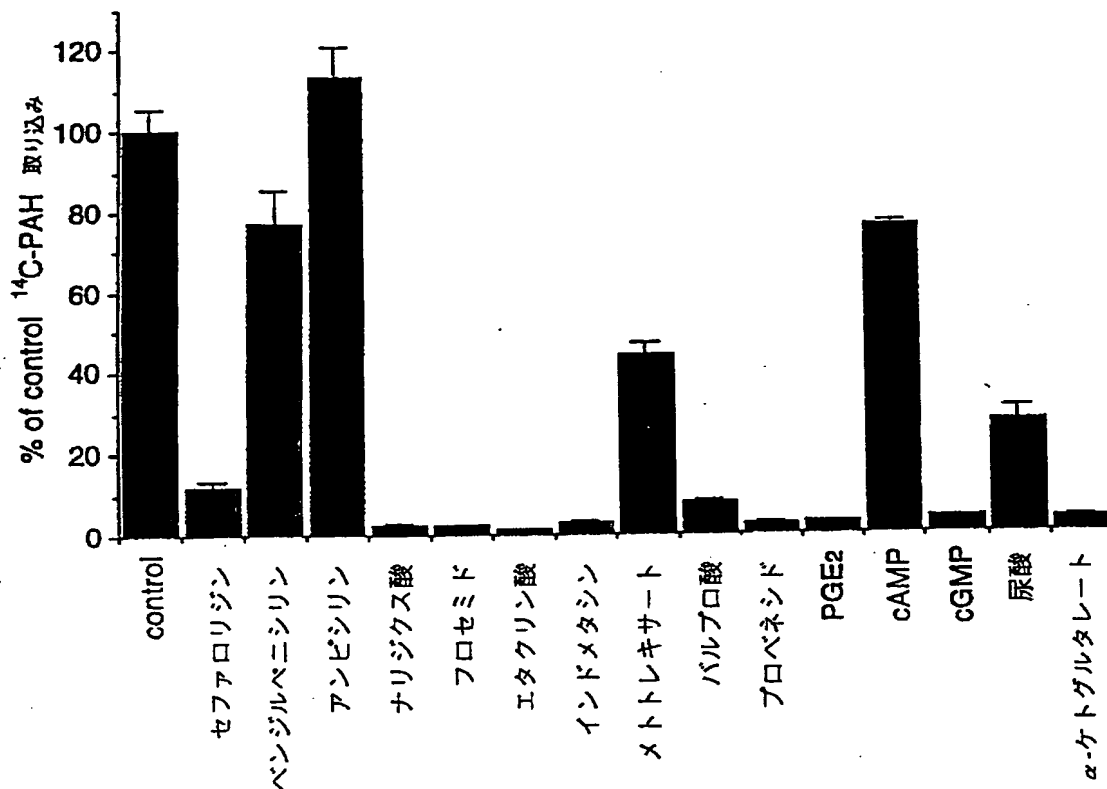
【図6】



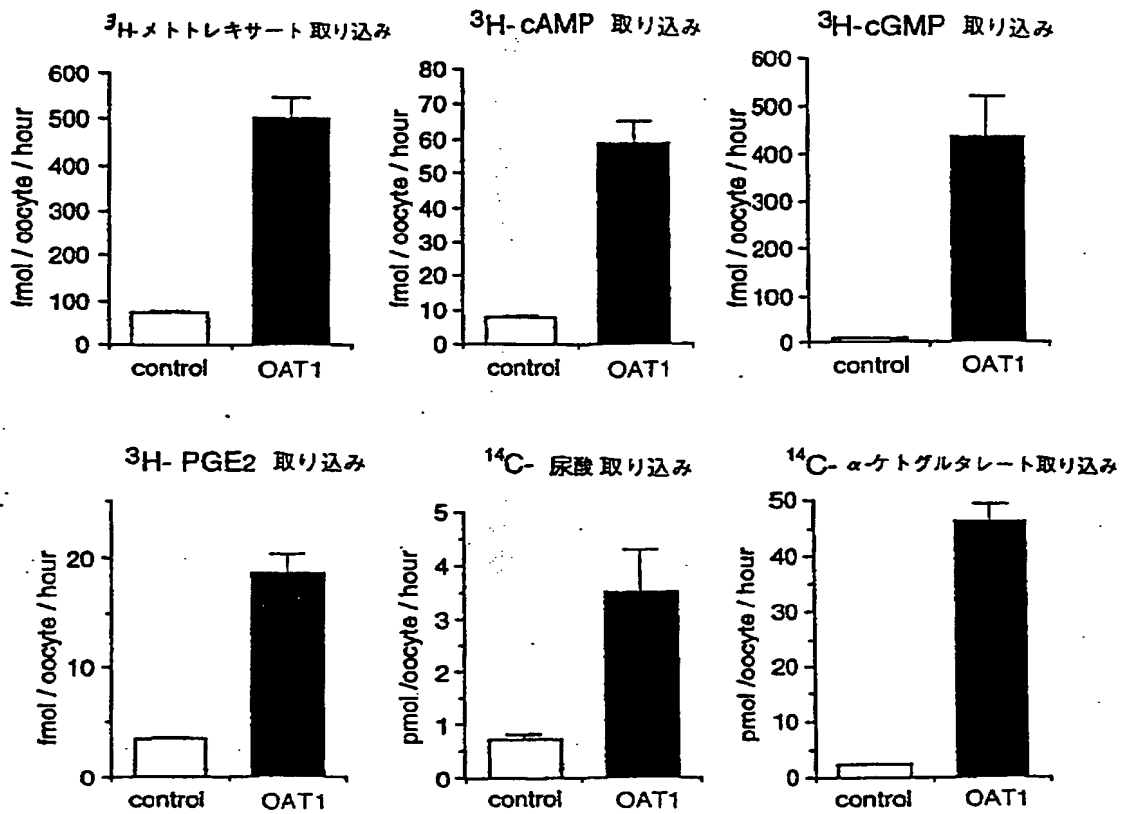
【図7】



【図8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な有機陰イオントランスポーター及びそれをコードする遺伝子を提供する。

【解決手段】 配列番号1もしくは2で示されるアミノ酸配列からなるか、又は、配列番号1もしくは2で示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなる、有機陰イオンを輸送する能力を有するタンパク質。前記タンパク質をコードする遺伝子。

【選択図】 なし

【書類名】
【訂正書類】

職権訂正データ
特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

597072006

【住所又は居所】

神奈川県相模原市由野台1-23-7

【氏名又は名称】

遠藤 仁

【代理人】

申請人

【識別番号】

100076923

【住所又は居所】

大阪府大阪市淀川区加島3-16-89 田辺製薬
株式会社内

【氏名又は名称】

箕浦 繁夫

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

597072006

【住所又は居所】

神奈川県相模原市由野台1-23-7

【氏名又は名称】

遠藤 仁

【代理人】

申請人

【識別番号】

100076923

【住所又は居所】

大阪府大阪市淀川区加島3-16-89 田辺製薬

株式会社内

【氏名又は名称】

箕浦 繁夫

特平 9-134182

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597072006]

1. 変更年月日 1997年 5月23日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県相模原市由野台1-23-7
氏 名 遠藤 仁